

**MENU****SEARCH****INDEX**

1/1

**JAPANESE PATENT OFFICE**ATTACHED
To
#10**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number: 06030778

(43)Date of publication of application: 08.02.1994

(51)Int.Cl.

C12N 15/13
C12N 1/19
C12P 21/08
// (C12N 1/19
C12R 1:84)
(C12P 21/08
C12R 1:84)

(21)Application number: 04212287

(71)Applicant:

TOSOH CORP

(22)Date of filing: 17.07.1992

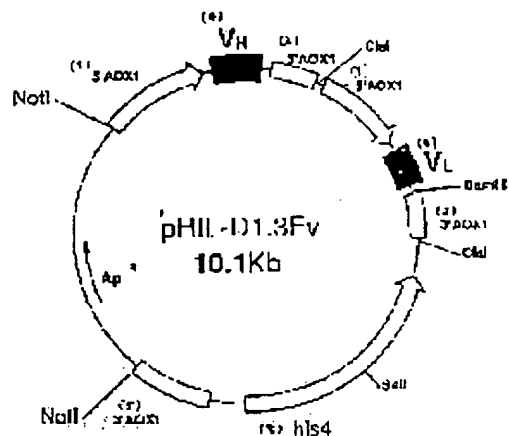
(72)Inventor:

**YAMADA MASAYUKI
YASUKAWA KIYOSHI**

(54) VECTOR FOR PRODUCING ANTIBODY WITH PICHIA YEAST, PICHIA YEAST TRANSFORMED WITH THE SAME VECTOR AND PRODUCTION OF ANTIBODY CHARACTERIZED BY CULTURING TRANSFORMED PICHIA YEAST

A.A.

CONSTITUTION: A vector contains two gene promoters of an alcohol oxidase derived from chromosome of yeast of *Pichia* existing in a gene region of alcohol oxidase derived from chromosome of yeast of *Pichia* wherein a gene encoding an H chain of an antibody having a terminator in an end region is linked to the 3' side of one promoter and a gene encoding an L chain of the antibody having a terminator in an end region is manifestably linked to the 3' side of the other.



[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998 Japanese Patent Office

MENU

SEARCH

INDEX

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号 -

特開平6-30778

(43)公開日 平成6年(1994)2月8日

(SI)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12N 15/13	ZNA	7236-4B		
1/19				
C12P 21/08	C	8214-4B		
//(C12N 1/19				
	8831-4B		C12N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数5(全13頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-212287

(22)出願日 平成4年(1992)7月17日

(71)出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市関成町4560番地

(72)発明者 山田 正幸

神奈川県相模原市若松6-1-27

(72)発明者 保川 清

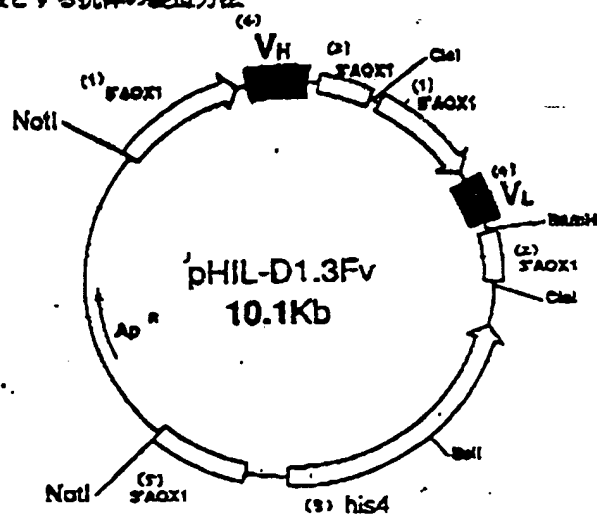
神奈川県相模原市相模大野7-37-17-401

(54)【発明の名称】 ビキア酵母により抗体を製造するためのベクター、該ベクターで形質転換されたビキア酵母及び形質転換ビキア酵母を培養することを特徴とする抗体の製造方法

(57)【要約】

【目的】 大腸菌等を宿主として抗体遺伝子を発現させて抗体分子を製造する方法と比較して、抗体分子製造量が大きく、かつ、製造操作後の抗体分子精製操作等が簡単な、遺伝子組換えで抗体分子を製造する方法等を提供する。

【構成】 ビキア酵母染色体由来アルコール酸化酵素遺伝子領域に存在する2つのビキア酵母染色体由来アルコール酸化酵素遺伝子プロモーターを含み、その一方の3'側には末端領域にターミネーターを有する抗体のH鎖をコードする遺伝子が、その他方の3'側には末端領域にターミネーターを有する抗体のL鎖をコードする遺伝子が、これらターミネーター及び抗体遺伝子が発現可能に連結されているベクター。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒキア酵母染色体由来アルコール酸化酵素遺伝子領域に存在する2つのヒキア酵母染色体由来アルコール酸化酵素遺伝子プロモーター含み、その一方の3'側には末端領域にターミネーターを有する抗体のH鎖をコードする遺伝子が、その他方の3'側には末端領域にターミネーターを有する抗体のL鎖をコードする遺伝子が、これらターミネーター及び抗体遺伝子が発現可能に連結されている、ベクター。

【請求項2】更に、該ベクターにより形質転換された宿主と形質転換されていない遺伝子を選択するための指標となる形質を宿主に付与する遺伝子及びヒキア酵母の染色体に該ベクターを組み込むための遺伝子を含む請求項1項記載のベクター。

【請求項3】プラスミドである請求項1又は2項記載のベクター。

【請求項4】請求項1又は2項記載のベクターにより形質転換されたヒキア酵母。

【請求項5】請求項3項記載のヒキア酵母を培養する操作を含む、抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒキア酵母により抗体を製造するためのベクター、該ベクターで形質転換されたヒキア酵母及び形質転換ヒキア酵母を培養することを特徴とする抗体の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】抗体は高度の抗原識別能力を備えた蛋白質であり、抗原識別能力を利用し、酵素等で標識した抗体を用いることによる微量抗原の好感度検出法が広く行われている。

【0003】抗体は、一般に抗原性物質を兎やヤギ等の動物に免疫することによってその血清中に得ることができる。また、抗原中の特定の抗原決定部位に対して数密な特異性を有するモノクローナル抗体は、例えばマウス等に抗原を投与して得た脾臓細胞とミエロマ細胞等を融合し、これをマウス腹腔や実験室で人工的に培養することで得ることができる。

【0004】近年になって様々な抗体遺伝子がクローニングされるに及び、目的抗体の遺伝子を大腸菌や酵母あるいは動物細胞に組み込んで発現する試みが行われている。抗体は通常H鎖2本とL鎖2本からなる4量体蛋白質であるが、遺伝子組み換えによって抗体遺伝子が発現させる場合には、H鎖遺伝子とL鎖遺伝子の全長を発現させずに、抗体の抗原結合能を担う、いわゆる可変領域を含むFab部分やFv部分に相当するH鎖遺伝子とL鎖遺伝子のみの部分蛋白を発現させることも可能である。

【0005】このように遺伝子組み換え技術で抗体又はその機能を持った部分蛋白を生産する場合、大腸菌、酵

2

母又は動物細胞を宿主として用いることになるが、抗体遺伝子を適当なプロモーターとターミネーター（転写終結領域）の間に挿入したベクター等を構築し、該ベクターで宿主を形質転換し、該宿主を培養してその上清中に抗体を分泌させる方法が一般的である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】抗体を遺伝子組み換えで製造する場合、H鎖をコードする遺伝子とL鎖をコードする遺伝子を同時にかつ同程度発現させ、しかも発現したH鎖蛋白質とL鎖蛋白質が正しく会合して効率よく分泌されるように操作する必要がある。

【0007】大腸菌を宿主として用いる場合（Skerra A. ら、Science 240 巻、1034-1041頁、1988年、Better M. ら、Science 240 巻、1041-1043 頁、1988年）には、分泌が期待できるのは細胞膜と細胞壁の間のいわゆるペリアラズムまでであり、培養液上清に分泌させることができず、抗体製造量が低下するという課題がある。また大腸菌を使用する場合には、培養の途中に菌が溶解するという現象も観察される。これらの課題のために大腸菌を使用する場合、抗体の製造量は極めて低くなってしまふ。更に、時として製造された抗体は抗原結合性が低下する、という課題もある。

【0008】動物細胞を宿主として用いる場合には、微生物を用いるよりもより本来の立体構造に近い構造を有した抗体の生産が期待できるものの、培養コストが高く、そのスケールアップが微生物に比べて困難である等の改善されるべき点がある。

【0009】

【課題を解決するための手段】パン酵母等に代表される酵母は、大腸菌や動物細胞両者の利点を兼ね備えた宿主として広く利用されているが、抗体の分泌生産については、非常に低い発現量であると報告されている（Arnold H. Horwitz ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 巻8678-8682 頁、1988年）。

【0010】本発明者らは、メタノール酸化性酵母であるヒキア酵母が高度の蛋白質分泌生産能力を有していること、また、メタノール酸化の際に最初に働く酵素でありヒキア酵母をメタノール存在下で培養した際に強力に発現するアルコール酸化酵素1（以下AOX1と呼ぶ）遺伝子のプロモーターとターミネーターの間に抗体遺伝子を挿入したベクターで形質転換したヒキア酵母によれば、抗体遺伝子をヒキア酵母染色体上に安定に保持させ得、かつメタノールによる効率的な抗体遺伝子発現の誘導が可能であり、しかも抗原結合性の高い抗体を培養液上清中に分泌発現させ得ることが可能なことを見出だし、本発明を完成させた。

【0011】即ち本発明は、ヒキア酵母染色体由来アルコール酸化酵素遺伝子領域に存在する2つのAOX1遺伝子プロモーター含み、その一方の3'側には末端領域にターミネーターを有する抗体のH鎖をコードする遺伝

50

3

子が、その他方の3側には末端領域にターミネーターを有する抗体のL鎖をコードする遺伝子が、これらターミネーター及び抗体遺伝子が発現可能に連結されているベクターである。また本発明は、前記ベクターにより形質転換されたヒキア酵母である。更に本発明は、前記ヒキア酵母を培養する操作を含む、抗体の製造方法である。以下に本発明を詳細に説明する。

【0012】本発明のベクターは、その一例として環状の形態を有する、いわゆるプラスミドであっても良く、宿主を形質転換した場合、形質転換した宿主と形質転換していない宿主を選択するための指標となる形質を宿主に付与する遺伝子や、宿主の染色体にそれ自身を組み込むための遺伝子を含んでいることが好ましい。

【0013】本発明のプラスミドの一例を図1に示す。図1のプラスミド (pHIL-D1.3Fv) は、AOX1遺伝子のプロモーター(1)、ターミネーター(2)、形質転換体を選別するための指標となる遺伝子(本図では、ヒスチジン合成遺伝子を示してある、3)及び抗体のH鎖又はL鎖をコードする遺伝子(4)を含んでいる。更に該プラスミドでヒキア酵母を形質転換したときに、1と相伴ってヒキア酵母染色体上のAOX1遺伝子と相同組み換えを起こすのに必要なAOX1遺伝子の下流領域(5)を含んでいる。ここで抗体の遺伝子は、AOX1遺伝子プロモーターと向きが一致するように、すなわち抗体遺伝子のN末をコードする領域がプロモーター側に位置するよう挿入する。

【0014】前記した形質転換体の選別を可能にする指標となる形質を宿主に付与する遺伝子としては、例えば、ヒスチジン要求性のヒキア酵母を宿主として使用する場合に、ヒスチジン合成遺伝子を使用することが例示できる。これにより宿主のヒスチジン要求性が消滅した場合には形質転換したことが理解できる。なおこれは一例であり、ヒスチジン要求性に限らず他のアミノ酸やヌクレオチドの要求性であっても良い。また特にこのような遺伝子を含まないベクターであっても、ヒキア酵母染色体上のAOX1遺伝子の位置にベクターが挿入された場合宿主のメタノール酸化性が弱くなるから、これを確認することで形質転換したことを理解できる。ここで、ヒキア酵母はAOX1遺伝子とは別に活性の弱いアルコール酸化酵素2(以下AOX2と呼ぶ)の遺伝子を有しているため、ベクターとの相同組み換えによりAOX1遺伝子が失われた後もメタノール酸化能を失うことはない。

【0015】以上のような本発明のベクター(プラスミド)を調製するには、例えば図2に示した、AOX1遺伝子のプロモーター(1)、ターミネーター(2)、形*

合成DNA-1(一本鎖) 5' GATCCGCGGCCGCG 3'
合成DNA-2(一本鎖) 5' GCGGCCGCG 3'

5 µl のDNA溶液Aと10 µl のDNA溶液Bを含む50 µl の緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、5 mM MgCl₂ ※12、5 mM ジチオスレイトール、0.6 mM ATP) にT4DN

4

質転換体を選別するための指標となるヒスチジン合成遺伝子(3)及びAOX1遺伝子の下流領域(5)を含むプラスミド(pAD 804、K.Sreekrishna ら、Biochemistry、28巻、p4117-4125、1989年)を使用すれば良い。

【0016】本発明のベクターで宿主であるヒキア酵母を形質転換する操作は通常の方法に従えば良く、特別の操作は必要ない。得られた形質転換体を培養する操作は、好ましくは、初めに例えばグリセロールを炭素源としてある程度高密度まで培養を行い、炭素源をメタノールに変換し培養を継続する等が例示できる。

【0017】以上の操作により、抗体が培地中に抗原結合能を有した形で分泌生産されるから、培養液上清を回収してクロマトグラフや硫酸沈殿等、通常の方法に従って精製操作を行うことで目的とする抗体を製造することができる。

【0018】

【実施例】以下、本発明をさらに詳細に説明するために実施例を記載するが、これらは本発明の一例であって本発明を制限するものではない。

【0019】実施例1 抗リゾチーム抗体Fv領域のVH部分をコードする遺伝子用発現ベクター、pHIL-D1.3VHの構築

(1) pHIL-N1の構築(図3)

プラスミド pAO804 (K.Sreekrishna ら、Biochemistry、28巻、p4117-4125、1989年)のDNA 2 µg を50 µl の緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM ジチオスレイトール)中でBgl II (5ユニット)により37℃で1時間消化し、反応液を等量のフェノール/クロロホルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿・回収した。回収したプラスミドDNAを10 µl のTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。以後、この溶解液をDNA溶液Aとする。

【0020】次式の合成DNA-1(2 µg、470 p.mol)と合成DNA-2(1.4 µg、470 p.mol)を含む50 µl の緩衝液(50 mM トリス-塩酸 pH 7.6、10 mM MgCl₂、10 mM メルカプトエタノール、0.3 mM ATP)にT4DNAキナーゼ(10ユニット)を添加して37℃で1時間反応させて5'末端をリン酸化した。

【0021】更に、上記反応液を70℃で10分間加熱した後、37℃で30分間加熱することによって合成DNA-1と合成DNA-2をアニーリングさせた。このアニーリングした合成DNA-1と-2を含む溶液を以後DNA溶液Bとする。

【0022】

※12、5 mM ジチオスレイトール、0.6 mM ATP) にT4DN Aリガーゼ(50ユニット)を添加した後、16℃で20時間

(4)

特開平6-30778

5

反応させた。反応後、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mMジチオスレイトール)に溶解し、Not I (10ユニット)を加え37°Cで1時間反応させ消化した。反応後、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したDNAを50 μ lの緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、5 mM MgCl₂、5 mMジチオスレイトール、0.6 mM ATP)に溶解し、更にT4DNAリガーゼ(50ユニット)を添加した後、16°Cで20時間反応させた。反応後、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mMジチオスレイトール)に溶解し、Bgl II (10ユニット)を加え37°Cで1時間反応させ消化した。この反応液10 μ lを使用して、既知の手法に従って大腸菌JM 109株を形質転換し、アンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLBプレートに塗布し、37°Cで一晩放置した。出現した大腸菌のコロニーをアンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLB培地に接種し、37°Cで一晩発育培養した。得られた菌体溶液からアルカリ溶解法によってプラスミドDNAを回収した。該プラスミドDNAは、Not Iでの消化によって約5200塩基対のDNA断片と約2600塩基対のDNA断片が生じることから目的のプラスミド(pHIL-N1)であることが確認された。

(2) pHIL-N2の構築(図4)

(1)に記載のプラスミドpHIL-N1のDNA 2 μ gを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mMジチオスレイトール)中でCla I (1ユニット)により37°Cで30分間消化し、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。上記DNA溶液5 μ lを含む25 μ lの緩衝液(66 mM リン酸カリウム pH 7.4、6.7 mM MgCl₂、1 mMメルカプトエタノール、0.25 mM dATP、0.25 mM dTTP、0.25 mM dGTP、0.25 mM dCTP)にDNAポリメラーゼのクレノウ断片(2ユニット)を添加し37°Cで30分間反応させた。反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したDNAを50 μ lの緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、5 mM MgCl₂、5 mMジチオスレイトール、0.6 mM ATP)に溶解し、更にT4DNAリガーゼ(50ユニット)を添加し、16°Cで20時間反応させた。この反応液10 μ lを使用して、既知の手法に従

6

て大腸菌 JM109株を形質転換し、アンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLBプレートに塗布し、37°Cで一晩放置した。出現した大腸菌のコロニーをアンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLB培地に接種し、37°Cで一晩発育培養した。得られた菌体溶液からアルカリ溶解法によってプラスミドDNAを回収した。該プラスミドDNAをSph IとCla Iで消化することで、約3200塩基対のDNA断片と約4600塩基対のDNA断片が生じたことから目的のプラスミド(pHIL-N2)が得られたことが確認された。

(3) pHIL-D1、3VHの構築(図5)

(2)のプラスミドpHIL-N2のDNA 5 μ gを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mMジチオスレイトール)中でEcoR I (10ユニット)により37°Cで1時間消化し、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。上記DNA溶液5 μ lを含む25 μ lの緩衝液(66 mM リン酸カリウム pH 7.4、6.7 mM MgCl₂、1 mMメルカプトエタノール、0.25 mM dATP、0.25 mM dTTP、0.25 mM dGTP、0.25 mM dCTP)にDNAポリメラーゼのクレノウ断片(2ユニット)を添加し、37°Cで30分間反応させ、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。以後、この溶解液をDNA溶液Cとする。

【0023】プラスミドpSW1VHD1.3Vd1.3Tag1(E.S.Wardら、Nature 341巻、p544-546、1989年)のDNA 5 μ gを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mMジチオスレイトール)中でSph I (10ユニット)により37°Cで1時間消化し、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを25 μ lの緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 8.8、6.7 mM MgCl₂、10 mMメルカプトエタノール、6.7 mM EDTA、0.25 mM dATP、0.25 mM dTTP、0.25 mM dGTP、0.25 mM dCTP)に溶解し、T4DNAポリメラーゼ(2ユニット)を添加し、37°Cで30分間反応させた。反応液から、VH遺伝子を含む約470塩基対のDNA断片を電気泳動によって精製した。精製したDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。以後、この溶解液をDNA溶液Dとする。

【0024】5 μ lのDNA溶液Cと5 μ lのDNA溶液Dを含む20 μ lの緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、5 mM MgCl₂、5 mMジチオスレイトール、0.6 mM ATP)にT4DNAリガーゼ(50ユニット)を添加し、16°Cで20時間反応させた。この反応液10 μ lを使用して、既

(5)

特開平6-30778

7

知の手法に従って大腸菌 JM109株を形質転換し、アンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLBプレートに塗布し、37 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。出現した大腸菌のコロニーをアンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLB培地に接種して37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。得られた菌体溶液からアルカリ溶解法によってプラスミドDNAを回収した。該プラスミドDNAは、EcoRIでの消化によって約470塩基対のDNA断片と約7800塩基対のDNA断片が生じること、またPst IとSal Iでの消化によって約3300塩基対のDNA断片、約2700塩基対のDNA断片及び約2300塩基対のDNA断片が生じることから目的のプラスミド(pHIL-D1.3VH)であることが確認された。

【0025】実施例2 抗リゾチーム抗体Fv領域のVL部分をコードする遺伝子の発現ベクターpHIL-D1.3VLの構築(図6)

プラスミドpAD 804のDNA5 μ gを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM ジチオスレイトール)中でEcoRI (10ユニット)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化し、反応液を等量のフェノール/クロロホルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。上記DNA溶液5 μ lを含む25 μ lの緩衝液(66 mM リン酸カリウム pH 7.4、6.7 mM MgCl₂、1 mM メルカプトエタノール、0.25 mM dATP、0.25 mM dTTP、0.25 mM dGTP、0.25 mM dCTP)にDNAポリメラーゼのクレノウ断片(2ユニット)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。反応後、反応液を等量のフェノール/クロロホルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。以後、この溶解液をDNA溶液Eとする。一方、プラスミドpSw1VHD1.3Vkl.3Tag1のDNA5 μ gを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM ジチオスレイトール)中でSph I (10ユニット)、EcoRI (10ユニット)、Pst I (10ユニット)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。反応後、反応液を等量のフェノール/クロロホルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを25 μ lの緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 8.8、6.7 mM MgCl₂、10 mM メルカプトエタノール、6.7 μ M EDTA、0.25 mM dATP、0.25 mM dTTP、0.25 mM dGTP、0.25 mM dCTP)に溶解し、さらにT4DNAポリメラーゼ(2ユニット)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。反応液から、VL遺伝子を含む約490塩基対のDNA断片を電気泳動によって精製した。精製したDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。以後、この溶解液をDNA溶液Fとする。

8

【0026】5 μ lのDNA溶液Eと5 μ lのDNA溶液Fを含む20 μ lの緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、5 mM MgCl₂、5 mM ジチオスレイトール、0.6 mM ATP)にT4DNAリガーゼ(50ユニット)を添加し、16 $^{\circ}$ Cで20時間反応させた。この反応液10 μ lを使用して、既知の手法に従って大腸菌 JM109株を形質転換し、アンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLBプレートに塗布し、37 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。出現した大腸菌のコロニーをアンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLB培地に接種して27 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。得られた菌体溶液からアルカリ溶解法によってプラスミドDNAを回収した。該プラスミドDNAは、EcoRI、Bam HIでの消化によって約480塩基対のDNA断片と約7800塩基対のDNA断片が生じること、またEcoRIとSal Iでの消化によって約5700塩基対のDNA断片及び約2600塩基対のDNA断片が生じることから目的のプラスミド(pHIL-D1.3VL)が得られたことが確認された。

【0027】実施例3 抗リゾチーム抗体Fv領域のVH部分をコードする遺伝子とVL部分をコードする遺伝子両者を発現するベクターpHIL-D1.3Fvの構築(図7)

(3)のプラスミドpHIL-D1.3VHのDNA5 μ gを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM ジチオスレイトール)中でCla I (10ユニット)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。反応後、反応液を等量のフェノール/クロロホルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。以後、この溶解液をDNA溶液Gとする。【0028】一方、実施例2に記載のプラスミドpHIL-D1.3VLのDNA5 μ gを50 μ lの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM ジチオスレイトール)中でCla I (10ユニット)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。反応液から、AOX1遺伝子上流領域、VL遺伝子及びAOX1遺伝子下流領域を含む約1800塩基対のDNA断片を電気泳動によって精製した。精製したDNAを10 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。以後、この溶解液をDNA溶液Hとする。

【0029】5 μ lのDNA溶液Gと5 μ lのDNA溶液Hを含む20 μ lの緩衝液(66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、5 mM MgCl₂、5 mM ジチオスレイトール、0.6 mM ATP)にT4DNAリガーゼ(50ユニット)を添加した後、16 $^{\circ}$ Cで20時間反応させた。この反応液10 μ lを使用し、既知の手法に従って大腸菌 JM109株を形質転換し、アンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLBプレートに塗布し、37 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。出現した大腸菌のコロニーをアンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含むLB培地に接種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。得られた菌体溶液からアルカリ溶解法によってプラスミドDNAを回収した。該プラスミ

ドDNAは、Cla Iでの消化によって約1800塩基対のDNA断片と約8300塩基対のDNA断片が生じること、またBam HIとSal Iでの消化によって約2000塩基対のDNA断片、約8100塩基対のDNA断片が生じることから目的のプラスミド(pHIL-D1.3Fv)が得られたことが確認された。

【0030】実施例4

実施例3のプラスミドpHIL-D1.3Fvでヒキア酵母を形質転換し、VII遺伝子とVL遺伝子がヒキア酵母染色体のAOX1遺伝子の位置に発現可能な形で組み込まれた目的の形質転換体を得た。

【0031】プラスミドpHIL-D1.3FvのDNA10μgを50μlの緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 7.5、50 mM NaCl、1 mMジチオスレイトール)中でNot I (20ユニット)により37℃で1時間消化した。反応後、反応液を等量のフェノール/クロロフォルムで抽出し、2倍量のエタノールを添加して消化されたプラスミドDNAを沈殿、回収した。回収したプラスミドDNAを10μlのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0、1 mM EDTA)に溶解した。IRL PRESS 社刊、DNA cloning vol.11p52に記載の方法に従って、ヒキア酵母GT 1155株(his-ヒスチジン要求性)のスフェロプラストを調製し、スフェロプラスト100 μlに対しNot Iで切断したプラスミドpHIL-D1.3FvのDNA溶液10μlを加え、前記方法に従って形質転換した。形質転換後、スフェロプラストを45℃のヒスチジンを含まないRD寒天培地(18.6 %ソルビトール、1%アガロース、2%グルコース、1.34% yeast nitrogen base、0.4 μg/ml biotin、0.2%his assay medium、およびグルタミン酸、メチオニン、リジン、ロイシン、イソロイシン各50 μg/ml)10 mlと混合後ヒスチジンを含まないRD寒天培地(アガロース濃度が1.5%である他はRD寒天培地と同じ組成)プレートに上層し、30℃にて3日間静置した。RD寒天培地上に出現したコロニーは、プラスミドpHIL-D1.3Fvで形質転換されてヒスチジン要求性を失った形質転換菌であるが、凝集したスフェロプラストから再生したコロニーであるので、純粋なクローンを得るために以下の操作を行った。すなわちRD寒天培地上に出現したコロニーを滅菌したつまようじで数百個につき、500 μlの滅菌水に懸濁したのち緩やかな条件で超音波処理を行うことにより菌の凝集を解いた。超音波処理を行った菌の懸濁液を、適当に希釈しMD寒天培地(1.5%寒天、1.34% yeast nitrogen base、0.4 μg/ml biotin、2%グルコース)に塗布し、30℃にて3日間静置した。以上の操作によりMD寒天培地上に、純粋なクローンであるコロニーが多数得られた。

【0032】つぎに、プラスミドpHIL-D1.3Fvで形質転換されてヒスチジン要求性を失った形質転換菌のうちVII遺伝子とVL遺伝子がヒキア酵母染色体のAOX1遺伝子の位置に発現可能な形で組み込まれた目的の形質転換体を得るために、以下の操作を行った。(1)で得られた

MD寒天培地上のヒスチジン要求性を失った形質転換菌のコロニー(his+コロニー)をMD寒天培地(1.5%寒天、1.34% yeast nitrogen base、0.4 μg/ml biotin、2%グルコース)とMD寒天培地(1.5%寒天、1.34% yeast nitrogen base、0.4 μg/ml biotin、0.8%メタノール)にスポットし、30℃で3日間静置した。MD寒天培地で生育の遅いコロニー(mut+コロニー)、すなわちAOX1遺伝子が欠損していると判定されるコロニーを目的の形質転換体(GTS115/pHIL-D1.3Fv mut+)と判定し、培養及び抗体生産の有無の検討に用いた。

【0033】実施例5 形質転換体による抗体の生産の確認

実施例4で得た形質転換体GTS115/pHIL-D1.3Fv mut+をYPD(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース)培地に植菌し、30℃で一晩発酵培養した。得られた一晩培養液200 μlを100 mlのBMY培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、1.34% yeast nitrogen base、0.4 μg/ml biotin、1%グリセロール、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 pH 6)に植菌し、30℃でOD 600値が約20に達するまで(約15時間)培養した。滅菌した遠心管を用いて培養液を遠心(3000g、5分間)し、得られた菌体を100 mlのBMY培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、1.34% yeast nitrogen base、0.4 μg/ml biotin、0.8%メタノール、0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH6)に再び懸濁したのち培養を続けVII遺伝子とVL遺伝子の発現を誘導し、BMY培地に懸濁後24時間ごとに1 mlのメタノールを添加しつつ100時間培養を続けた。

【0034】対照としてVII遺伝子、VL遺伝子を含まないベクターpHIL-D1で形質転換したヒキア酵母GTS115/pHIL-D1 mut+も同様にして培養した。培養終了後培養液を遠心(3000g、5分間)し、上清300 μlに170 μlの60%トリクロロ酢酸を加え混合後、氷中に1時間放置した。遠心分離後、沈澱を常法に従って還元条件下で15% SDS-PAGEを行ったのち、100倍希釈の兔抗マウスFv血清と500倍希釈のヤギ抗兔IgG血清-horse radish peroxidaseを用いて常法にしたがってウェスタンブロッティングを行った。その結果、培養上清中に抗リゾチーム抗体FV断片が生産されていることが確認された。その生産量はSDS-PAGEのバンドの強さから判定して約5 μg/lであると推定された。

【0035】実施例6 生産された抗リゾチーム抗体の抗原であるリゾチームへの結合性の確認

実施例5で得られたGTS115/pHIL-D1.3Fv mut+の培養液50 mlを緩衝液(20 mM トリス-塩酸 pH 7.5、500 mM NaCl)3lに対して透析した。ニワトリリゾチーム1 μgを7.5% SDS-PAGEにかけたのち、上記透析液を10倍希釈した液と100倍希釈の兔抗マウスFv血清、および500倍希釈のヤギ抗兔IgG血清-horse radish peroxidaseを用いて常法にしたがってウェスタンブロッティングを行った。その結果、生産された抗リゾチーム抗体Fv断片は

11

抗原であるニワトリリゾチームに対して結合能を有していることが確認された。

【0036】

【発明の効果】AOX1プロモーターとターミネーターの間に抗体遺伝子を挿入する本発明によれば、大腸菌と動物細胞両者の利点を兼ね備えているものの抗体の生産については低い発現量しか報告されていない酵母において、そのH鎖とL鎖を同時にかつ同程度発現させることが可能である。この結果、発現されたH鎖とL鎖は正しく会合して免疫活性を有する抗体分子を製造できる。しかも、製造された免疫活性を有する抗体分子は培養液中に分泌されるから、その培養中に酵母が溶解するという現象は生じず、製造量の低下を招くことはない。従って本発明は、酵母を培養して培養液を取得し、これを適当な方法で精製するだけで抗体を製造できるから、従来の大腸菌を使用する抗体の製造に比較して精製操作等は簡単である。

【0037】本発明によれば、マウス等の動物を使用しなくても抗体分子を製造することが可能であり、しかも製造された抗体は同一遺伝子に由来する、同一性質を有するものである。従来、このようなモノクローナル抗体は複雑な操作でしか取得できなかったが、本発明ではより簡単に製造できる。また、マウス等を使用して抗体を製造する場合、大量の抗体を取得するにはより多くの動物を飼育する必要があったが、本発明では酵母の培養規模を大きくするだけで大量製造が可能になる。

【0038】しかも本発明では、挿入する遺伝子を変えることで、一種類ではなく種々の抗体分子を製造するこ

12

とも可能であるし、ヒト抗体遺伝子とマウス遺伝子等を結合させものを挿入すればキメラ抗体を製造可能であり、更には抗体分子のL鎖やH鎖のみを製造することも可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のベクターの一例を示す図である。

【図2】図2は、図1に記載した本発明のベクターを構築する出発材料となるベクターの一例を示すものである。

【図3】図3は、本発明の実施例1(1)において構築した、pHIL-N1の構築操作を示す図である。

【図4】図4は、本発明の実施例1(2)において構築した、pHIL-N2の構築操作を示す図である。

【図5】図5は、本発明の実施例1(3)において構築した、pHIL-D1.3VHの構築操作を示す図である。

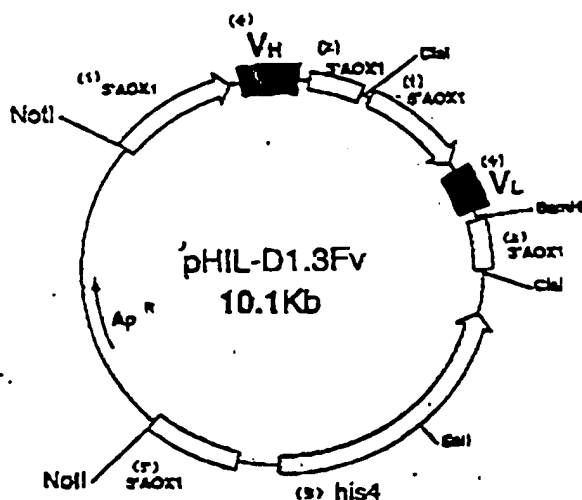
【図6】図6は、本発明の実施例2において構築した、pHIL-D1.3VLの構築操作を示す図である。

【図7】図7は、本発明の実施例3において構築した、pHIL-D1.3Fvの構築操作を示す図である。

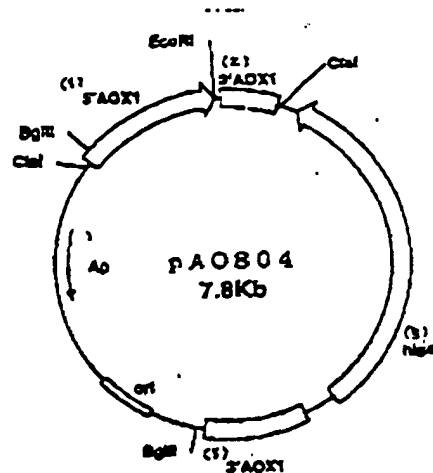
【符号の説明】

- 1 AOX1遺伝子のプロモーター
- 2 ターミネーター
- 3 形質転換体を選別するための指標となる遺伝子(ヒスチジン合成遺伝子)
- 4 抗体のH鎖又はL鎖をコードする遺伝子
- 5 AOX1遺伝子の下流領域

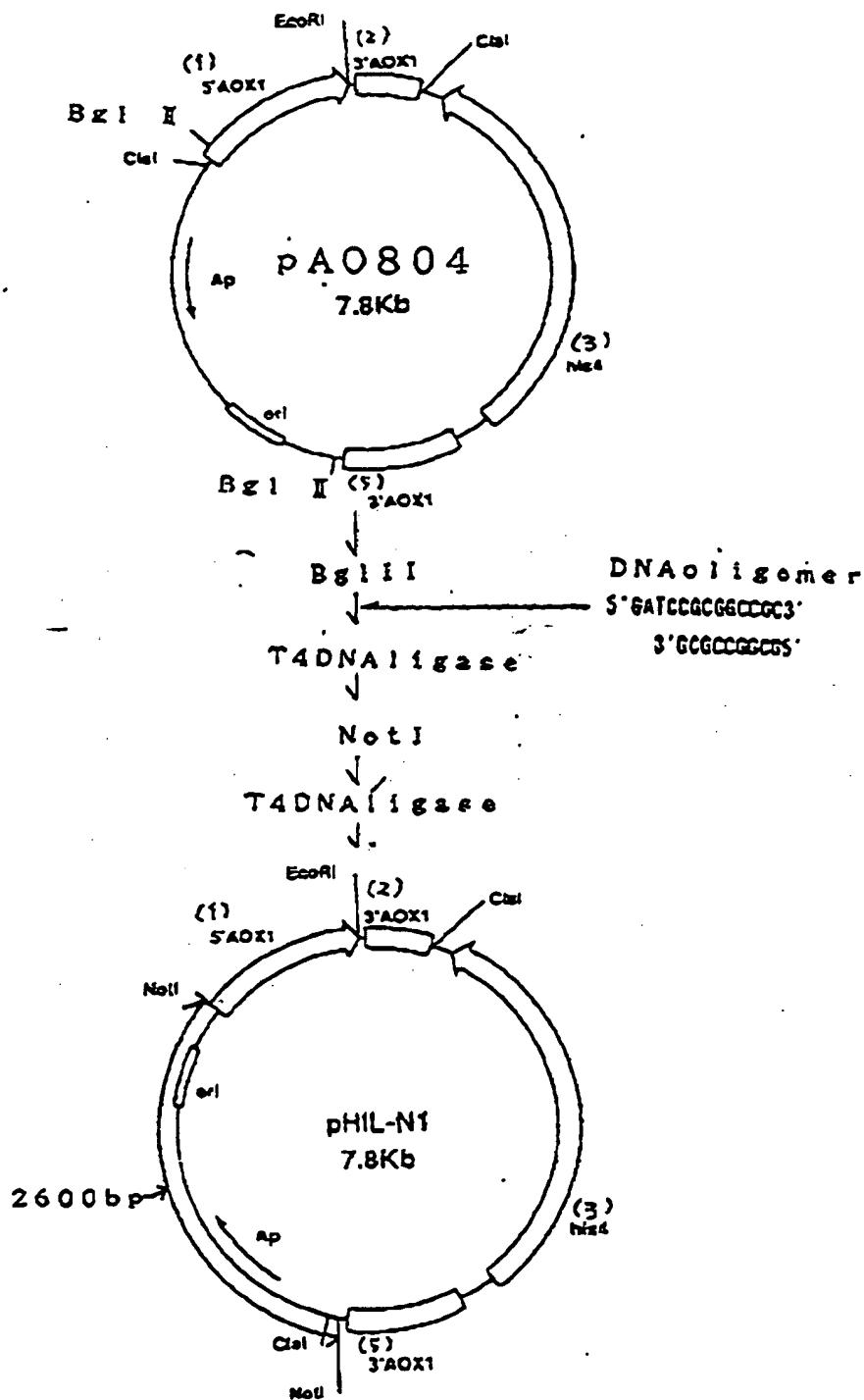
【図1】



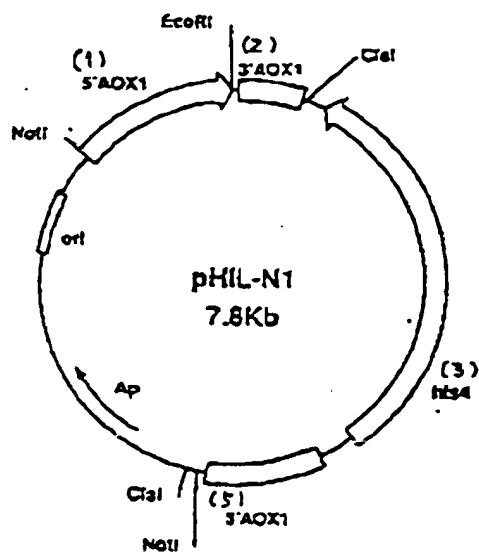
【図2】



【図3】

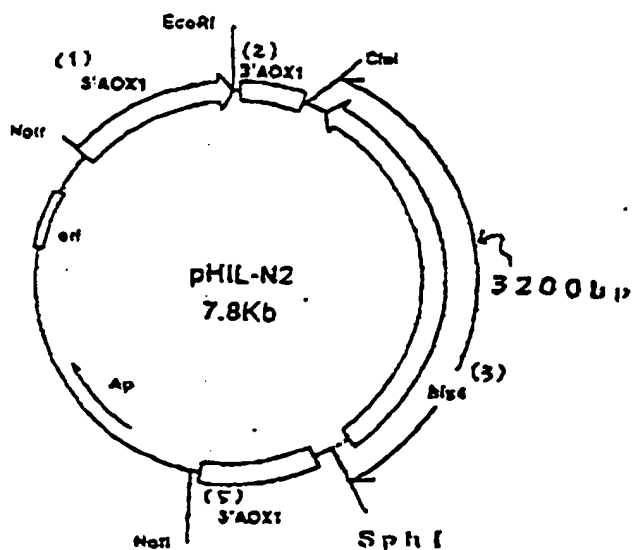


【図4】



ClaI partial cut

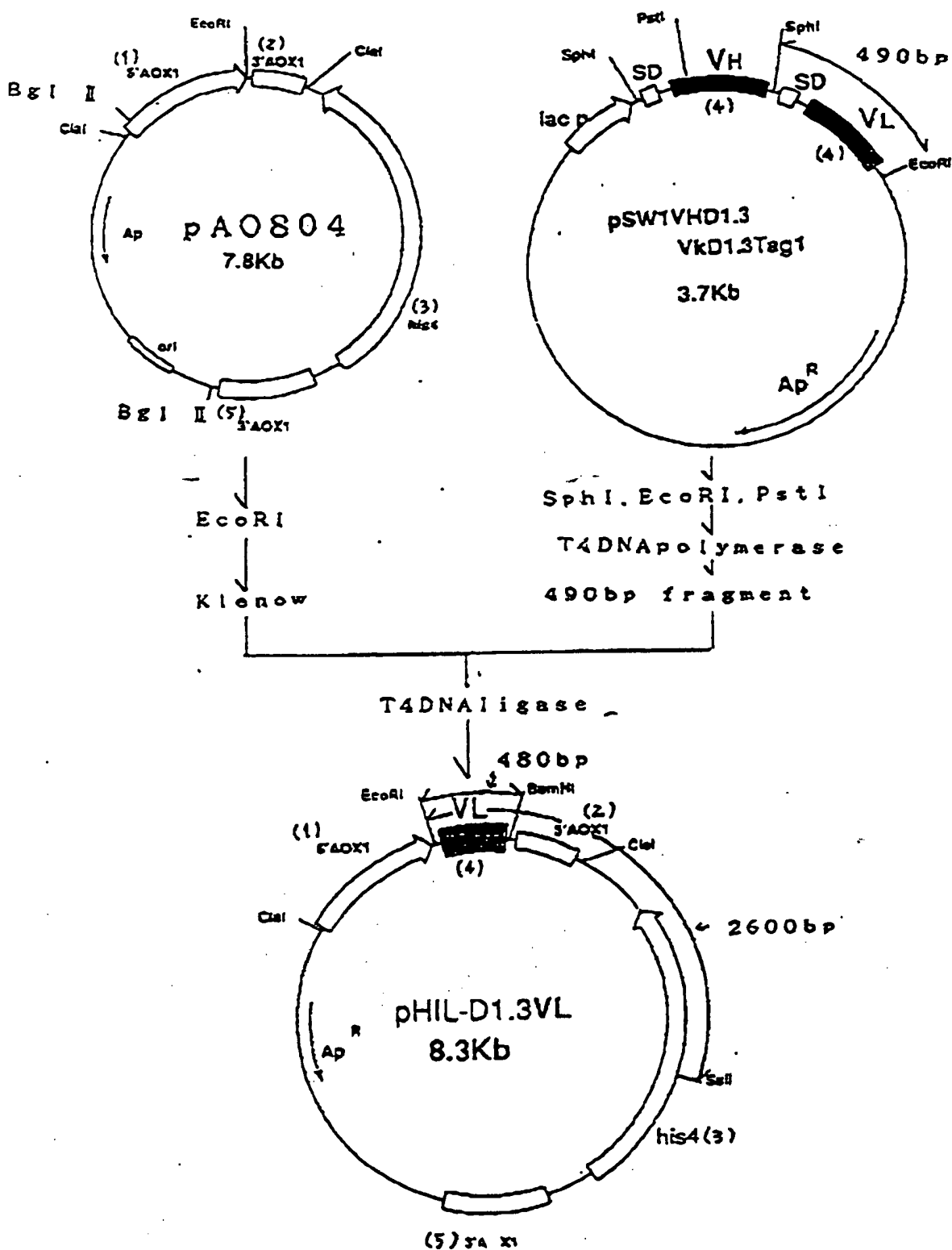
T4DNA ligase



(11)

特開平6-30778

【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C12R 1:84)

(C12P 21/08

C12R 1:84)